

文章编号: 0253-2697(2007)05-0089-04

稠油开采微生物的生理生化特征及其对原油特性的影响

王春明¹ 李大平² 刘世贵¹

(1. 四川大学生命科学院生物资源与生态环境教育部重点实验室 四川成都 610064;

2. 中国科学院成都生物研究所 四川成都 610041)

摘要: 从原油及含油污水中分离并培育出一株能有效地降解稠油中重质组分的菌株 3-28, 其生理生化特征和分子鉴定结果表明, 该菌株属于微杆菌属(*Microbacterium*)。用该菌株对渤海和新疆等油田的稠油进行了微生物降解实验, 分析了细菌降解对原油粘度等物理特征的改变及其对饱和烃、芳烃以及胶质、沥青质各组分在原油中相对含量和内部组成的影响。结果表明, 该菌株降解作用使原油性质发生了明显变化: 渤海绥中 36-1 油田的原油粘度降低 24.9%, 凝固点降低 5.2℃; 克拉玛依油田的原油粘度降低 32.4%, 凝固点降低 7.7℃; 绥中 36-1 油田的原油中饱和组分和芳烃组分含量增加 8.0%, 克拉玛依油田的原油增加 21.4%; 沥青质含量分别降低了 37.5% 和 58.7%。原油组成也发生了一定的变化, 原油饱和烃轻、重组分比值增加, 改善了原油的理化特征。

关键词: 微生物采油技术; 稠油开采; 微杆菌 3-28; 生物降解; 稠油理化特征; 实验研究

中图分类号: TE357.9

文献标识码: A

Effects of biophysiological and biochemical characteristics of a strain of *microbacterium* sp. on properties of thickened oil

Wang Chunming¹ Li Daping² Liu Shigui¹

(1. Key Laboratory for Bio-resources and Eco-environment of the Ministry of Education, Life Sciences College of Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Chengdu Institute of Biology, Chinese

Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: A strain of *microbacterium* sp. 3-28 was screened to biodegrade the asphaltene fraction of crude oil in Bohai Oilfield and Karamay Oilfield. The effects of microbe degradation on the components and composition among the saturated hydrocarbons, aromatic hydrocarbons, resins and asphaltene fractions in oils were analyzed. The results showed that the physicochemical characteristics of crude oil changed obviously under the effect of *microbacterium* sp. 3-28. The viscosity of oils in Suizhong 36-1 and Karamay oilfields decreased by 24.9% and 32.4% respectively, and the freezing points decreased by 5.2℃ and 7.7℃ respectively. The saturated hydrocarbons and aromatic hydrocarbons increased by 8.0% and 21.4% respectively, and the asphaltene fraction decreased by 37.5% and 58.7% respectively. The fraction ratio of short chain to long chain of the saturated hydrocarbon got higher after biodegradation of oil. The quality of the thickened oil was greatly improved.

Key words: microbial enhanced oil recovery; thickened oil exploitation; *Microbacterium* sp. 3-28; biodegradation; physicochemical characteristics of thickened oil; laboratory research

微生物采油技术的研究已有 70 多年的历史, 微生物采油技术以其成本低、适应性强、作业简单、对产油层无伤害和环境友好等优势已经得到了越来越广泛的应用^[1], 世界上许多国家开展了微生物采油矿场试验, 但主要应用于稀油油藏的开采^[2]。目前在我国探明石油储量中, 开发难度较大的重油、稠油接近 40 亿 t, 主要集中在渤海湾盆地, 渤海油田重油、稠油在海油中所占的比例达到 80%~90%, 新疆油田的稠油产量约占全国稠油总产量的 1/3。稠油中富含胶质、沥青质, 具

有高凝固点、难流动、难开采和高成本等特点^[3]。利用微生物可以从两方面改善稠油物性: ①通过减少稠油中的大分子组分, 降低其平均分子量; ②微生物产生的生物表面活性物质、酸、气等代谢产物能够大幅度降低原油粘度。胶质、沥青质是原油中分子量最大、极性最强的组分, 同时也是造成油藏难开发的一个主要因素^[4], 微生物对其很难降解^[5]。笔者从渤海绥中 36-1 的油田含油废水中分离、筛选、选育出一种能有效降解稠油中胶质和沥青质的菌株, 并研究了该菌株对原油

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-SW-114)部分成果。

作者简介: 王春明, 女, 1973 年 4 月生, 1995 年毕业于四川大学, 现为四川大学博士研究生, 中国科学院成都生物研究所助理研究员, 主要研究方向为环境污染的生物修复及微生物采油。E-mail: springerw@sohu.com

理化特性的影响。

1 材料筛选及培养方法

1.1 微生物菌株筛选

为优选适合开采特重原油油藏的微生物,首先以原油乳化分散的能力作为初筛标准,然后按原油的降粘及代谢原油产生表面活性剂和产酸的能力进行复筛。实验中分别选择渤海油田和新疆油田原油进行研究,这些原油的相对体积质量分别为 0.95 和 0.98,胶质、沥青质含量均在 35% 以上。

菌种分离自绥中 36-1 油田的含油废水。

实验基础培养基包括: 1.0 g/L NaNO_3 ; 1.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 7.0 g/L K_2HPO_4 ; 3.0 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 2 mL 微量元素液, pH 为 7.0。

微量元素培养基包括: 0.1 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.425 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.05 g/L ZnCl_2 ; 0.01 g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.015 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.01 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.01 g/L $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

将适量含油污水接种于基础培养基中,置于 40℃、转速为 150 r/min 的摇床培养 7~10 d; 然后每 2 d 取样一次,涂原油平板,挑取能在原油平板上不同形态的单个菌落接种于牛肉膏固体培养基上,划线纯化; 将纯化的菌落接种于以原油为唯一碳源的液体培养基中培养,选择可以乳化原油的单个菌落。

菌株形态和生理生化特征鉴定方法: 对所选菌株进行了系列生理生化特性实验,参照《简明第八版伯杰氏细菌鉴定手册》进行了鉴定^[6]。

对菌株 16SrDNA 的聚合酶链式反应(PCR)进行扩增和测序: 以 3-28 菌株的总 DNA 为模板,正向引物为 UNI-F 为 5'-GTGACGGGCGGTGTGTACAAG-3', 反向引物 UNI-R 为 5'-TAGATACCCTGGTAGTC-CACGC-3'。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 90 s, 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 按此步骤共循环进行 30 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。对 PCR 反应产物进行电泳检测, 纯化测序工作由上海英骏生物技术有限公司完成。测序结果用 Gene Bank 中的 Blast 软件进行同源性比较。

1.2 培养方法

以菌 3-28 为种子, 以绥中 36-1 油田和克拉玛依油田稠油为唯一碳源, 在 250 mL 三角瓶中装入基础培养基 100 mL, 加入原油 2 g, 高温灭菌后接入菌量质量分数为 2% 的菌 3-28。培养条件为: 摇床温度 40℃, 转速 120~150 r/min, 培养时间 2~7 d。同时提供了不加菌的空白对照油样。然后分别检测原油和培养液在微生物作用前后发生的变化。

2 实验样品物性的测定

用 JYW-200C 全自动表面张力仪测定了表面张力, 测量温度为 25℃, 表示菌株产表面活性剂的能力。采用瑞士梅特勒 Delta320 台式 pH 计测定 pH 值。

在 3 个 250 mL 锥形瓶中分别装 40 g 原油、30 mL 3-28 菌液和 30 mL 无机种子培养基, 接种量质量分数为 2%。在 40℃ 摇床振荡培养 48 h, 沥出液体, 于 75~80℃ 脱水 48 h。用德国 Haake Rv300 粘度计于 50℃、剪切速率 20 s⁻¹ 下测脱水原油粘度。以不接种的反应瓶样品为对照计算降粘率, 参照中华人民共和国石油天然气行业标准 SY/T 0541-1994 方法测定原油凝固点。

按照中华人民共和国石油天然气行业标准 SY/T 5119-1995 方法进行原油族组分分析。为了进一步了解微生物降解原油的情况, 将分离获得的饱和烃、芳香烃进行色谱分析。分别采用中华人民共和国石油天然气行业标准 SY/T 5779-1995 和 SY/T 6196-1996 进行分析。

3 菌种特征

菌株 3-28 的形态及生理生化特征测试结果见表 1。

表 1 菌株 3-28 的表面形态特征及生理生化特征
Table 1 Morphological characters and biophysiological-biochemical characters of *Microbacterium* sp. 3-28

表面形态	特征	生理生化	特征	生理生化	特征
革兰氏染色	G ⁻	淀粉水解酶	阳性	苯丙氨酸脱氨酶	阴性
菌落大小/mm	0.5~1	明胶水解	阴性	吡啉反应	阴性
是否产生色素	否	接触酶	阳性	乙酰甲基甲醇反应	阴性
菌落颜色	红色	细胞色素	阴性	H ₂ S 气体产生	阴性
菌落形态	短杆	氧化酶	阳性	反硝化反应	阳性
芽孢	阴性	柠檬酸盐利用	阴性	木糖	阴性
		甲基红反应	阴性	葡萄糖	阳性

菌株 3-28 的 16SrDNA 序列分析 PCR 扩增得到 1 条约 0.6 Kb 的特征带, 其全序列特征表明: 3-28 菌的 16SrDNA 序列长 580 bp, 其中: A 为 139 bp, C 为 154 bp, T 为 119 bp, G 为 168 bp。(G + C) 含量为 55.5%。

采用 Blast 分析法, 将 3-28 菌的 16SrRNA 基因序列与 GenBank 数据库进行比较发现, 该菌与微杆菌属(*Microbacterium*) 最为接近, 16SrRNA 基因序列同源性高达 100%。因此, 以原油为碳源生长较快的菌 3-28 的表面形态特征、生理生化特征和 16SrDNA 的 PCR 扩增产物测序结果表明, 筛选得到的 3-28 菌株属

于微杆菌属(*Microbacterium* sp.)。

4 微生物降解对原油理化特征的影响

4.1 原油乳化效果与培养液 pH 值的变化

细菌降解稠油的生物化学过程中会产生生物表面活性物质,将稠油乳化成水包油或油包水乳状液。团块状稠油经菌液处理 24 h 后,出现了一系列表现特征:原油在培养基介质中出现均匀分散,且分散体系较为稳定;回收的原油对玻璃表面的附着性减少,易于从容器表面分离出来。培养基的表面张力经细菌作用后发生变化(表 2),表面张力分别降低了 31.4% 和 36.3%。同时,该细菌还具有较强的产酸能力,溶液 pH 值由培养前的中性变为弱酸性。

表 2 微杆菌 3-28 在稠油培养基中表面张力及 pH 值的变化
Table 2 Surface tension and pH value of medium before and after treatment of *Microbacterium* sp. 3-28

原油来源	表面张力/(mN·m ⁻¹)		pH 值	
	菌 3-28 处理后	对照油样	菌 3-28 处理后	对照油样
绥中 36-1 油田	35.5	55.7	6.74	7.02
克拉玛依油田	45.8	66.8	6.89	7.02

4.2 原油粘度与凝固点的变化

微杆菌 3-28 在对原油烃的生物降解过程中能将长碳链的组分降解成短碳链的组分,使原油的凝固点降低,流动性增强。绥中 36-1 油田原油经菌 3-28 处理后,原油粘度下降了 24.9%,凝固点也下降了 5.2℃;新疆油田原油粘度降低了 32.4%,凝固点下降 7.7℃(表 3),说明该菌株能够很好地改善原油物性。

表 3 微杆菌 3-28 作用前后原油粘度和凝固点的变化
Table 3 Viscosity and freezing point of crude oil before and after treatment of *Microbacterium* sp. 3-28

原油来源	粘度/(mPa·s)		凝固点/℃	
	菌 3-28 处理后	对照油样	菌 3-28 处理后	对照油样
绥中 36-1 油田	181.94	242.35	5.2	10.4
克拉玛依油田	706.20	1045.05	10.5	18.2

4.3 原油族组成的变化

对微生物处理前后的渤海绥中 36-1 油田和新疆克拉玛依油田的稠油进行了族组分分析,得到饱和烃、芳香烃、沥青质及非烃组成的含量(表 4)。微生物处理后,原油的饱和烃、芳烃、沥青质和胶质的含量发生波动,这是由于细菌选择性消耗原油不同组分的结果^[7],同样的菌种,处理不同的原油,原油族组成变化量不一致。3-28 菌株对绥中 36-1 和新疆油田稠油处理后,使得原油沥青质含量分别降低了 37.5% 和

58.7%,饱和组分和芳烃组分含量增加了 8.0% 和 21.4%,显然,菌株会选择性地消耗不同组分,使芳烃和沥青质含量产生波动。原油在微生物作用后的变化仅为其族组分百分比的相对变化,而不是芳烃、沥青质等转变为饱和烃^[8-11]。但是,经过微生物处理后,原油物性得到明显改善。

表 4 微杆菌 3-28 作用前后原油族组分质量分数
Table 4 Composition of thickened oil before and after treatment *Microbacterium* sp. 3-28

原油来源		原油组分的质量分数 / %			
		饱和烃	芳烃	胶质	沥青质
绥中 36-1 油田	菌 3-28 处理后	34.67	25.50	29.52	10.31
	对照油样	32.31	23.02	28.18	16.49
克拉玛依油田	菌 3-28 处理后	38.70	17.89	35.35	8.06
	对照油样	27.53	16.95	35.98	19.54

5 原油饱和烃及芳烃气相色谱分析

对分离获得的原油饱和烃、芳烃进行了气相色谱分析,饱和烃气相色谱分析结果见表 5。绥中 36-1 油田原油受细菌作用后,∑nC₂₁₋/∑nC₂₂₊ 值由作用前 0.845 增加到 1.027,克拉玛依油田原油从 0.758 增加到 0.872。这说明原油的烃分布发生了明显变化,短链正构烷烃含量相对增加,而长链正构烷烃含量则相对减少。姥鲛烷(Pr)和植烷(Ph)是原油中的生物标志化合物,结构比较稳定,细菌作用一般不影响它的含量^[12]。姥鲛烷 Pr/nC₁₇、植烷 Ph/nC₁₈ 是衡量生物降解原油的参数,生油学常把 Pr/nC₁₇ 和 Ph/nC₁₈ 两个比值作为生物降解原油因子的重要指标,可判别原油降解的程度。经细菌处理后,Pr/nC₁₇ 有不同程度的增加,表明原油被细菌降解后,其正构烷烃减少,异构烷烃相对增多。总体上,原油在受微生物作用后,短链正

表 5 原油经微杆菌 3-28 处理前后饱和烃气相色谱分析结果
Table 5 GC analysis of saturated hydrocarbons before and after treatment of *Microbacterium* sp. 3-28

原油来源	∑nC ₂₁₋ /∑nC ₂₂₊	Pr/nC ₁₇	Ph/nC ₁₈	烃分布 / %					
				<C ₁₅	<C ₂₀	<C ₂₅	<C ₃₀	<C ₃₅	
绥中 36-1 油田	菌 3-28 处理后	1.027	0.621	0.311	3.06	30.16	63.80	87.53	96.66
	对照油样	0.845	0.591	0.300	2.56	28.26	61.89	86.66	96.05
克拉玛依油田	菌 3-28 处理后	0.872	0.633	0.316	3.30	30.68	63.78	87.72	96.87
	对照油样	0.758	0.574	0.303	3.07	30.11	62.88	86.49	96.09

构烷烃的含量会相对增加,而长链正构烷烃含量则相对减少。这说明微生物可有选择性地裂解长链正构烷烃,并影响原油的物理特征,使其流动性增强。

经微生物降解后,原油芳烃中菲系列的含量和组成都发生了较大的变化(表6)。菌株选择性地降解了菲系列中的不同组分,引起甲基菲指数(MPI)和二甲基菲指数(DPI)的变化。原油中的菲系列一般认为是来自甾萜化合物的裂解。由于烷基在非环上位置不同,其稳定性也有差异^[13]。一般处在 β 位的甲基,如3-甲基和2-甲基菲较稳定;在 α 位的1-甲基、4-甲基菲以及处于中位的9-甲基菲比较活跃,二甲基菲也有相似规律;从 $\alpha\alpha$ 型、 $\alpha\beta$ 型和 $\beta\beta$ 型稳定性依次增高。细菌作用后,原油的MPI和DPI指数值均有较大提高,

表6 微杆菌3-28处理前后原油芳烃的气相色谱组成

Table 6 GC analysis of aromatic hydrocarbons before and after treatment of *Microbacterium* sp. 3-28

原油来源	菲系列质量分数/%	MPI	DPI	
绥中36-1油田	菌3-28处理后	14.68	0.97	1.06
	对照油样	12.24	0.77	0.86
克拉玛依油田	菌3-28处理后	14.99	1.02	1.25
	对照油样	13.24	0.82	0.94

说明菲系列中化学性质较为活跃的组分易被实验菌株降解,菌解作用使原油成熟度有一定的提高。随着成熟度的增加,原油表现在较轻的芳烃组分逐渐增多,萘、甲基萘、二甲基萘、三甲基萘的含量也随之增多,而非、甲基菲、二甲基菲的含量明显降低;芳烃化合物朝着更稳定的萘环结构演化,菲与萘类化合物自身亦丢失甲基,而由三甲基向二甲基、甲基芳烃化合物转化。因此可用萘类化合物间的比值、菲与萘的比值以及菲类化合物之间的比值来表征原油的成熟度。甲基菲指数和二甲基菲指数为菲类化合物之间的比值,这2个指数值增高,表示原油成熟度增加。

6 结论

(1) 通过一系列的筛选培育,从油层原油、含油污水中分离出一株能够有效地降解稠油中胶质、沥青质的细菌3-28,经生理生化及分子鉴定,菌3-28为微杆菌(*Microbacterium* sp.)。

(2) 菌3-28作用于不同稠油,在不加入其他碳源的情况下,原油的饱和烃相对含量增加,胶质沥青质相对含量降低,其物理性质能得到改善。

(3) 菌3-28能够改变原油胶质、沥青质的组成和结构,主要引起胶质、沥青质内含氧基团和甲基、亚甲基的出现或者其含量增加,使原油的成熟度提高。

参考文献

- [1] Nelson S J. Stripper well production increased with MEOR treatment [J]. Oil & Gas Journal, 1991, 89(1): 114-116.
- [2] Inanov M V, Belyaev S S, Borzenkov I A, et al. Additional oil production during field trials in Russia [M]. MEOR Recent Advances Develop Petroleum Science Series 39, 1993: 373-382.
- [3] 沈德煌, 张义堂, 张霞, 等. 稠油油藏蒸汽吞吐后转注 CO₂ 吞吐开采研究[J]. 石油学报, 2005, 26(1): 83-86.
Shen Dehuang, Zhang Yitang, Zhang Xia, et al. Study on cyclic carbon dioxide injection after steam soak in heavy oil reservoir [J]. Acta Petrolei Sinica, 2005, 26(1): 83-86.
- [4] 廖译文, 耿安松. 油藏开发中沥青质的研究进展[J]. 科学通报, 1999, 44(19): 2018-2024.
Liao Zewen, Geng Ansong. Development of the study on asphaltene in the oil reservoir exploitation [J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44 (19): 2018-2024.
- [5] 唐纳森 E C, 奇林加林 G V, 晏 T F. 微生物提高石油采收率 [M]. 金静芷, 王修垣, 秦同洛, 译. 北京: 石油工业出版社, 1995: 102-115.
Donaldson E C, Chilingarian G V, Yen T F. Microbial enhanced oil recovery [M]. Translated by Jin Jingzhi, Wang Xiuhuan, Qin Tongluo. Beijing: Petroleum Industry Press, 1995: 102-115.
- [6] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 简明伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 370-391.
Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 8th ed. Translated by a translation team of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology in Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing: Science Press, 1984: 370-391.
- [7] 张廷山, 兰光志, 邓莉, 等. 微生物降解稠油及提高采收率实验研究 [J]. 石油学报, 2001, 22(1): 54-57.
Zhang Tingshan, Lan Guangzhi, Deng Li, et al. Experiments on heaving oil degradation and enhancing oil recovery by microbial treatments [J]. Acta Petrolei Sinica, 2001, 22(1): 54-57.
- [8] Santamaria M M, George R E. Controlling paraffin deposition related problems by the use of bacteria treatments [R]. SPE 22851, 1991: 351-361.
- [9] 阿特拉斯 R M. 石油微生物学 [M]. 黄第藩, 译. 北京: 石油工业出版社, 1991: 1-39.
Atlas R M. Petroleum microbiology [M]. Translated by Huang Difan. Beijing: Petroleum Industry Press, 1991: 1-39.
- [10] Bryant R S. Review of microbial technology for improving oil recovery [J]. SPE Reservoir Engineering, 1989, 5(2): 1354-1411.
- [11] Premuzic E T, Lin M S. Induced biochemical conversions of heavy crude oils [I]. Journal of Petroleum Science & Engineering, 1999, 22(1): 171-180.
- [12] 马宝东, 王其伟, 王红艳, 等. 滩北油田昌74井微生物采油室内性能评价研究 [J]. 油田化学, 1999, 16(1): 64-67.
Ma Baodong, Wang Qiwei, Wang Hongyan, et al. Destructive and oil displacing behavior of three bacterial species for waxy crude oil from Well Chang 74 [J]. Oilfield Chemistry, 1999, 16(1): 64-67.
- [13] Trebbau G L, Nunez G J, Caira R L, et al. Microbial stimulation of lake maracaibo oil wells [R]. SPE 56503, 1999: 267-277.